

AVALIAÇÃO DE "KITS" COMERCIAIS DE TESTE ELISA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DOENÇA DE GUMBORO EM PLANTÉIS AVÍCOLAS VACINADOS

E.N.C. Tessari, A.L.S.P. Cardoso, A.G.M. de Castro

Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Instituto Biológico, Rua Bezerra Paes, 2278, CEP 13690-000, Descalvado, SP, Brasil. E-mail: etessari@linkway.com.br

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi comparar a sensibilidade de dois "kits" comerciais (A e B) para teste ELISA, na detecção de títulos médios de anticorpos contra o vírus da doença infecciosa da bursa (VDIB). Foram utilizados amostras de soros de pintainhos colhidos ao 1º, 4º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º e 49º dias de idade, colheu-se 20 amostras de sangue em cada uma das idades, em três diferentes granjas localizadas em Araraquara, SP. As aves foram vacinadas no 14º dia de idade, via água de bebida com vacina viva atenuada, grupo genômico G3, cepa Mouthrop G 603. Os resultados mostraram que o "kit B" que tem adsorvido em suas placas regiões genômicas VP2 e VP3 é mais sensível que o "kit A" ($p < 0,05$), que tem adsorvido em suas placas partículas virais íntegras, na detecção de anticorpos contra VDIB.

PALAVRAS-CHAVE: Teste ELISA, Gumboro, Aves.

ABSTRACT

EVALUATION OF COMMERCIAL ELISA TESTE "KITS" FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST THE VIRUS OF GUMBORO DISEASE IN VACCINATED FLOCK. The objective of this work was to compare the sensitivity of two commercial "Kits" for detection of antibodies titres against virus of the infectious bursal disease (IBDV) through the ELISA test. Blood samples were obtained on the 1st, 4th, 7th, 14th, 21th, 35th, 42th and 49th days of age, 20 samples being take for each of the ages, from three different farms located in Araraquara, SP. The poultry were vaccinated on 14th day of age through drinking water with live attenuated vaccine, genomic group G3, Mouthrop G 603 strain. The results showed that the "kit B" that was impregnated in their VP2 and VP3 genomic region plates is more sensitive than the "kit A" ($p < 0.05$) that was impregnated in their plates whole particles plantes, in the detection of antibodies against IBDV.

KEY WORDS: ELISA test, Gumboro, poultry.

INTRODUÇÃO

A doença infecciosa da bursa ou doença de Gumboro (DIB) é uma das principais moléstias da criação avícola. É uma doença transmissível de etiologia viral (BROWN, 1986). Afeta aves jovens causando grandes prejuízos para a indústria avícola. O vírus multiplica-se nos tecidos linfóides com predileção pela "bursa de Fabricius", destruindo células linfóides causando imunossupressão e aumento da suscetibilidade a outras doenças infecciosas (TANIMURA & SHARMA, 1997). A depleção linfocitária causada pelo vírus da DIB depende da idade da ave, sendo mais grave, quanto mais jovem esta for (SHARMA, 1984).

O vírus da DIB (IBDV) é do gênero Birnavírus e membro da família Birnaviridae e seu genoma consiste em dois segmentos de RNA de fita dupla, composto

de um segmento menor (2800 bp) denominado de B e outro maior (3400 bp) denominado A. As proteínas estruturais virais estão localizadas principalmente no segmento A (MULLER *et al.*, 1979; STEGER *et al.*, 1980).

A estrutura viral é constituída de 5 proteínas designadas VP1, VP2, VP3, VP4 e VP5 (TODD & MACNULTY, 1979; BETCH, 1988; DOHMS *et al.*, 1981). A proteína VP1, expressa a função de RNA-polimerase do segmento menor ou B e pode ter relação com a expressão de virulência, VP2 está localizada no capsídeo externo do vírus e está relacionada com a antigenicidade do vírus, VP3 está localizada no capsídeo interno e é responsável pela conformação estrutural do vírus, VP4 é uma protease viral que não é incorporada na partícula madura do vírus (ITO *et al.*, 1990).

DI FABIO (2001) relatou que as regiões mais importantes do vírus são a VP2 e VP3 e que o antígeno VP2

contém epítomos que induzem a produção de anticorpos que neutralizam o vírus, existindo assim uma correlação direta entre o título de anticorpos neutralizantes específicos, para a fração VP2 do vírus e a proteção conferida às aves. A região proteica VP2 foi identificada como antígeno protetor, pois contém uma região antigênica responsável pela indução de anticorpos neutralizantes e pela especificidade do sorotipo.

BETCH & MULLER (1988) demonstraram que os epítomos neutralizantes encontravam-se na região proteica VP2 do vírus da DIB, esta região está relacionada com a antigenicidade do vírus, ou seja, contém expressões de epítomos que induzem uma resposta imunológica. Por esta razão esta proteína é conhecida como epítomo de neutralização, através dela permite-se efetuar a diferenciação dos sorotipos e subtipos virais (Ito *et al.*, 2001).

O período de incubação do vírus e o aparecimento dos sinais clínicos é extremamente curto, cerca de dois a três dias (SIMON & ISHIZUDA, 2000).

GIAMBRONE *et al.* (1978) demonstraram experimentalmente que anticorpos neutralizantes podem ser detectados após 12 dias da infecção e que também pode-se isolar o vírus neste período, após várias passagens em embriões de galinhas.

Os efeitos imunossupressivos foram reportados por ALLAN *et al.* (1972) e por FARENGHER *et al.* (1974).

A síntese reduzida de IgG e a produção de IgM somente na forma monomérica, após a infecção pelo IBVDV pode explicar a resposta imunológica humoral reduzida aos antígenos (SHARMA & ROSENBERGER, 1987).

Nas aves infectadas pelo IBVDV não ocorre somente uma imunossupressão para resposta vacinal, verifica-se também uma maior susceptibilidade a outras doenças como: coccidiose (ANDERSON *et al.*, 1977), doença de Marek (SHARMA, 1984), anemia hemorrágica, dermatite gangrenosa, laringotraqueíte infecciosa (ROSENBERGER & GELB, 1978), bronquite infecciosa, salmoneloses e colibaciloses (WYETH, 1975).

O teste ELISA tem se tornado um instrumento fundamental para a melhoria do manejo sanitário das granjas de frangos, com uma simples amostra de soro, pode-se detectar os títulos de anticorpos, com grande especificidade e sensibilidade (SNYDER, 1990), sendo um eficiente teste para mensurar títulos de anticorpos contra o vírus da DIB em aves (NAQI *et al.*, 1983). Esse ensaio foi desenvolvido para detecção de anticorpos para vírus da DIB e é também utilizado para avaliar a eficácia de vacinas (HOWIE & THORSEN, 1981; SOLANO *et al.*, 1985a).

Esta técnica, combinada com "software" de computador, possibilita vários tipos de operações como: monitoria do programa de vacinação, detecção da ocorrência de exposição a alguma infecção e com precisão avaliar os resultados dos títulos de anticorpos (SNYDER *et al.*, 1983; SOLANO *et al.*, 1985b; SOLANO *et al.*, 1986).

Com base nos resultados destes testes, vários programas de imunização em aves jovens estão sendo desenvolvidos e sugeridos aos criadores de frangos (SOLANO *et al.*, 1986). Este teste é desde os anos 80, o principal instrumento de monitoria, mapeamento e de diagnóstico auxiliar da DIB. As grandes vantagens dessa prova são muito conhecidas, como rapidez, sensibilidade, automação, reprodutibilidade e uniformidade de resultados (DI FABIO, 2001).

O objetivo do presente estudo foi comparar a sensibilidade de dois "kits" A e B, comerciais para pesquisa de anticorpos contra DIB através do teste de ELISA, em frangos de corte, em diferentes idades, em três granjas de criação avícola vacinados distintos. As placas do "kit" B utilizadas no presente estudo para realização do teste ELISA são adsorvidas com os antígenos do VDIB correspondentes à regiões protéicas, VP2 e VP3. O "kit" A contém placas sensibilizadas com partículas virais íntegras do VDIB (WITT, 2000). O controle sorológico de um plantel avícola tem por objetivo determinar os níveis de imunidade materna, determinar imunocompetência, avaliar e reajustar programas de vacinação, diagnosticar surtos de doença e avaliar a biossegurança na granja, portanto, a utilização de "kits" que apresentem melhores resultados na detecção de anticorpos, é de relevância para a indústria avícola.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados pintainhos pesando em média 48 gramas, de linhagem Ross, machos e fêmeas procedentes de matrizes com 58 semanas de idade. Estas aves receberam no incubatório vacina para imunização contra doença de Marek, alojadas em três diferentes granjas, denominadas 1, 2 e 3, situadas na região de Araraquara, Estado de São Paulo, Brasil, até o quadragésimo nono dia de idade quando foram para o abate. Após o alojamento das aves foi colhido aleatoriamente, sangue de 20 pintainhos de cada uma das granjas que foram acondicionados em caixas de isopor com gelo e levados para o Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Descalvado, Instituto Biológico, SP, para obtenção dos soros que foram colhidos e acondicionados individualmente em frascos esterilizados e mantidos em freezer a 20° C negativos para posterior análise. Aos quarenta e dois dias de idade das aves, foram colhidas "bursas de Fabricius" de 5 aves por cada uma das granjas para genotipagem do Vírus da Doença Infecciosa da Bursa (VDIB), através do teste de Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphisms (RT-PCR/RFLP) (JACKWOOD *et al.*, 1994) que consiste na amplificação de uma região do gene VP2 com posterior digestão com

enzimas de restrição. Estes testes foram realizados pela "Simbios Tecnologia".

As aves foram vacinadas, via água de bebida, no décimo quarto dia de idade com vacina viva atenuada do "tipo forte", grupo genômico G3, cepa de origem Moulthrop G 603, nome comercial Avimmune – F (Coopers), produzida em ovos embrionados.

Foram utilizados para o teste ELISA dois "kits" comerciais, IBD-XR¹ ("kit" B) e IBD¹ ("kit" A), para detecção de anticorpos contra o vírus da Doença Infecciosa da Bursa (DIB), nos soros das aves.

Os resultados obtidos com os diferentes "kits", no teste ELISA foram analisados estatisticamente empregando-se o teste de Tukeys Studentized Range (HSD), utilizando-se sistema SAS (Statistical Analysis System), ao nível de significância 0,05.

RESULTADOS

Avaliando-se os títulos médios da três granjas estudadas, 1, 2 e 3 e considerando-se o primeiro, quarto, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia de idade das aves, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) quando foram comparados os "kits" A e B, como mostra a Fig. 1.

Quando são avaliados os títulos médios das três granjas estudadas, relativos aos vigésimo oitavo, trigésimo quinto, quadragésimo segundo e quadragésimo nono dias de idade das aves, observa-se uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$), nos valores dos títulos médios de anticorpos contra o VDIB, como mostra a Fig. 2.

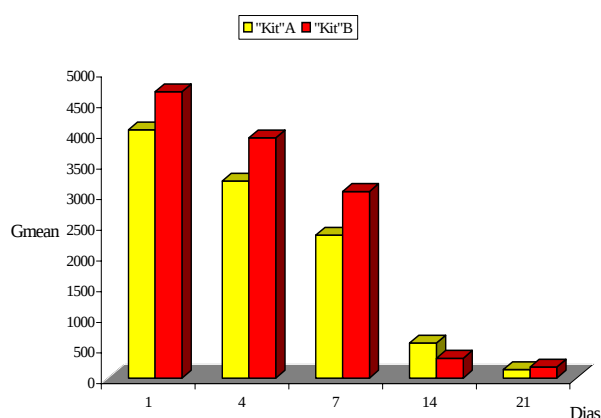


Fig. 1 - Títulos médios de anticorpos contra VDIB, obtidos das aves nas três granjas estudadas (1, 2 e 3), no primeiro, quarto, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia de idade das aves, comparando "kits" A e B.

Os resultados obtidos com o PCR realizado com as "bursas de Fabricius", baseados em seqüências descritas na literatura, bancos de genes, análise de vacinas comerciais e de amostras provenientes de estudos de campo, classificaram as amostras de vírus encontrados como:

Granja 1-apresentou resultado compatível com vírus do grupo molecular G3, classificado como vacinal.

Granja 2-apresentou resultado compatível com vírus do grupo molecular G16, este é compatível com padrões de variantes brasileiras.

Granja 3 - apresentou resultados compatíveis com infecção mista, ou seja, nas "bursas de Fabricius" encontrou-se vírus de um grupo molecular G3, vacinal e vírus de variante brasileira do grupo G16.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As doenças imunossupressoras de aves têm provocado grandes prejuízos à avicultura. A DIB está amplamente distribuída e as estratégias de controle tem que, em princípio, garantir uma boa transferência de imunidade passiva das matrizes para a progênie e uma boa imunização ativa (FUSSEL, 1998).

JACKWOOD *et al.* (1999) indicaram que a porcentagem de proteção contra cepas clássicas e variantes do vírus da DIB em frangos de corte e matrizes pode melhorar quando se utiliza VP2 como antígeno, ou seja, os "kits" que utilizam a região protéica VP2 adsorvido em suas placas apresentam melhores resultados, estes dados coincidem com os resultados obtidos no presente trabalho.

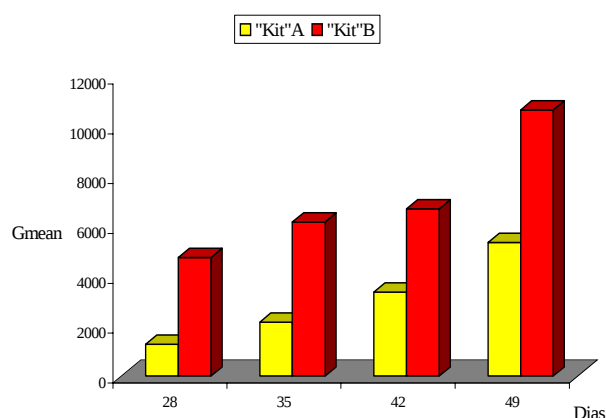


Fig. 2 - Títulos médios de anticorpos contra VDIB das aves, nas três granjas estudadas (1, 2 e 3), considerando-se os vigésimo oitavo, trigésimo quinto, quadragésimo segundo e quadragésimo nono dias de idade das aves, comparando-se os "kits" A e B.

¹Idexx Laboratories

No presente estudo observou-se que o "kit" B, o qual tem adsorvido em suas placas como antígeno partes das regiões protéicas VP2, VP3, tem maior sensibilidade para detectar anticorpos contra cepas variantes e vacinais que o "kit" A, o qual apresenta fixado em suas placas como antígeno, partículas íntegras do VDIB.

Quando se avalia os valores médios dos títulos de anticorpos maternos, ou seja, entre o primeiro e o décimo quarto dias de idade das aves, os "kits" A e B não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Os mesmos resultados foram obtidos por JACKWOOD *et al.* (2001).

Os títulos médios de anticorpos contra DIB obtidos nos diferentes galpões estudados no presente trabalho foram confrontados com os resultados de PCR o qual indicou a presença de padrões de restrição compatíveis com cepas variantes brasileiras do grupo molecular G16, que tem se mostrado de grande ocorrência e de forma disseminada em todo o país e cepas vacinais do grupo molecular G3, o qual coincide com o grupo molecular presente na vacina, Avimmune F, que foi administrada nas aves no décimo quarto dia de idade, nos galpões G2 e G3.

No galpão G1, o padrão de restrição encontrado foi compatível com cepa vacinal, descrito para o grupo molecular G3.

Os resultados sorológicos e do PCR mostraram-se compatíveis e confirmou a maior eficiência do "kit" B em detectar anticorpos contra cepas variantes e vacinais da DIB.

JACKWOOD *et al.* (2001) em seus experimentos concluíram que o "kit" B, IBD-XR, detecta soroconversão, em média, após dez dias do contato com o antígeno. Os resultados do presente trabalho coincidem com os do referido pesquisador.

Ao final do experimento analisando-se os resultados dos títulos médios de anticorpos obtidos com os testes ELISA e comparando-se com os resultados do PCR, conclui-se que o "kit" B (IBD-XR) apresentou-se mais sensível na detecção de títulos de anticorpos contra o VDIB, causada por cepas variantes e vacinais, visto que a diferença estatística entre os títulos médios de anticorpos contra VDIB comparando-se os dois "kits" estudados foi bastante acentuada após o vigésimo oitavo dia de idade das aves, quando os títulos de anticorpos resultantes da vacinação começaram a apresentar conversão e quando as aves das granjas 2 e 3 começaram a sofrer um desafio imunológico por cepas de vírus classificados como variantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN W.H.; FARAGHER, J.F.; CULLEN, G.A. Imunossupression by the infections bursal agent in chickens immunized

against Newcastle disease. *Vet. Rec.*, v.90, p.511-512, 1972.

ANDERSON, W.I.; REID, W.M.; LUKERT, P.D.; FLETCHER, O.J. Influence of infectious bursal disease on the development of immunity to *Eimeria tenella*. *Avian Dis.*, v.21, p.637-641, 1977.

BETCH, H.; MULLER, H.; MULLER, H.K. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, v.69, p.631-640, 1988.

BROWN, F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai. *Intervirology*, v.25, p.141-143, 1986.

DI FABIO, J. Gumboro: Vacinação no incubatório. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas, SP. *Anais*. Campinas: 2001. p.195-205.

DOHMS, J.E.; LEE, K.P.; ROSENBERGER, J.K. Plasma cell changes in the gland of harder following infectious bursal disease virus infection of the chicken. *Avian Dis.*, v.25, p.683-695, 1981.

FARAGHER, J.T.; ALLAN, W.H.; WYETH, C.J. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Vet. Rec.*, v.95, p.385-388, 1974.

FUSSEL, L.W. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases. *Poultry Science*, v.77, p.1193-1196, 1998.

GIAMBRONE, J.J.; FLETCHER, O.J.; LUKERT, P.D.; PAGE, R.K.; EIDSON, C.E. Experimental infection of turkeys with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.22, p.451-458, 1978.

HOWIE, R & THORSEN, J. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious bursal disease virus. *Can. J. Comp. Med.*, v.45, p.51-55, 1981.

ITO, N.M.K. Infectious bursal disease: A case report. *Bras. J. Vet. Res. Sci.*, v.27, n.1, p.99-110, 1990.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI, S. *Doença de Gumboro: Revisão de literatura, avanços em biotecnologia e novos conhecimentos*. Campinas: Spave Consultoria/ Elanco, 2001. 76p [Manual Técnico].

JACKWOOD, D.J.; JACKWOOD, R.J. IBDV: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. *Avian Dis.*, v.38, p.531-537, 1994.

JACKWOOD, D.H.; SOMMER, S.E.; ODOR, E. Correlation of enzyme-linked immunosorbent assay titers with protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.43, p.189-197, 1999.

JACKWOOD, D.H.; LEATHERS, V.; SMITH, J. Infectious bursal disease virus field challenge: Correlation of IBD-XR ELISA titers and virus detection using RT / PCR. Ohio: Food Animal Health Research Program, The Ohio State University, 2001.

MULLER, H.; SCHOLTISSEK, C.; BECHT, H. Genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J. Virol.*, v.31, p.584-589, 1979.

NAQI, S.A.; MARQUEZ, B.; SAHIN, N. Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunizations. *Avian Dis.*, v.27, p.623-631, 1983.

ROSENBERGER, J.K. & GELB, J.J.R. Response to several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.22, p.95-105, 1978.

- SHARMA, J.M. Effect of infectious bursal disease virus on protection against Marek's disease by turkey herpesvirus vaccine. *Avian Dis.*, v.28, p.629-640, 1984.
- SHARMA, J.M. & ROSEMBERGER, J.K. Imunodepressão pelo vírus da doença infecciosa bursal. Doenças imunossupressoras das aves. *Clipping Patologia Aviária Pfizer*, p.16-19, 1987.
- SIMON, V.A. & ISHIZUDA, M.M. Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricius – DIB. In: BERCHIERI JÚNIOR, A., MACARI, M. (Ed.). Doença das aves. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000. p.301-314.
- SNYDER, D.B.; MARQUARDT, W.W.; RUSSEK, E. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. II. Comparison of computational methods for measuring antibody titer in a single serum dilution. *Avian Dis.*, v.27, p.474-484, 1983.
- SNYDER, D.B. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.*, v.19, p.419-423, 1990.
- SOLANO, W.; GIAMBRONE, J.J.; WILLIAMS, J.C.; LAUERMAN, L.H.; PANANGALA, V.S.; GARCES, C. Effect of maternal antibody on timing of initial vaccination of young White Leghorn chickens against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.30, n.4, p.648-652, 1985a.
- SOLANO, W.; GIAMBRONE, J.J.; PANANGALA, V.S. Comparison of a kinetic-based enzyme-linked immunosorbent assay (KELISA) and virus-neutralization test for infectious bursal disease virus. I. Quantitation of antibody in white leghorns hens. *Avian Dis.*, v.29, p.662-671, 1985b.
- SOLANO, W.; GIAMBRONE, J.J.; PANANGALA, V.S. Comparison of a kinetic-based enzyme-linked immunosorbent assay (KELISA) and virus-neutralization test for infectious bursal disease virus. II. Decay of maternal antibody in progeny from white leghorns receiving various vaccination regimens. *Avian Dis.*, v.30, p.126-131, 1986.
- STEGE, D.; MULLER, H.; RIESNER, D. Helix-core transitions in double-stranded viral RNA: Fine resolution melting and ionic-strength dependence. *Biochim. Biophys. Acta*, v.606, p.274-285, 1980.
- TANIMURA, N. & SHARMA, J.M. Appearance of T cells in the bursa of Fabricius and cecal tonsils during the acute phase of infectious bursal disease virus infection in chickens. *Avian Dis.*, v.41, p.638-645, 1997.
- TODD, D. & McNULTY, M.S. Biochemical studies with infectious bursal disease virus: Comparison of some of its properties with infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virol.*, v.60, p.265-277, 1979.
- WITT, J.J. Estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. In: Seminary Idexx, 2000, Campinas. *Anais*. 2000. p.1-10. Campinas:2000. p.1-10.
- WYETH, P.J. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *S. typhimurium* and *E. coli* infections. *Vet. Rec.*, v.96, p.238-243, 1975.

Recebido em 29/10/02

Aceito em 2/1/03